



FEASIBILITY OF HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR THE FORENSIC ANALYSIS OF RED BALLPOINT PEN INKS

Loong Chuen LEE, Eng Leng LEE, Ab Aziz ISHAK

Faculty of Health Science, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia

Abstract

The counterfeiting of documents written with a ballpoint pen is a common phenomenon in the modern world. The aim of the presented study was to investigate the feasibility of applying high performance thin layer chromatography (HPTLC) to the forensic analysis of red ballpoint pen inks. Inks were extracted from writings on white office paper using methanol. The separation was performed using a solvent mixture of ethyl acetate, methanol and distilled water (70:35:30, v/v/v) as the mobile phase. The writing inks were first classified according to their main dye component. Differentiation was then attempted by taking other minor dyes into account. The results showed that the ink samples could be divided into three groups, even though similarities between the chromatograms were very high. The greatest diversity of chromatogram profiles was revealed for ink entries written using pens of different brands. The results showed that HPTLC could be an effective and reliable tool for characterizing and identifying red ballpoint pen inks.

Key words

High performance thin layer chromatography; Forensic ink analysis; Discrimination power; Questioned documents; Red ballpoint pen inks.

Received 22 November 2013; accepted 22 March 2014

1. Introduction

Forensic ink analysis is an important part of forensic investigations into the authenticity of questioned document analysis. Techniques that have been studied for analyzing ballpoint pen inks include spectroscopic and chromatographic techniques [5, 6, 7]. There are a lot of papers presenting the discriminating powers of various techniques, particularly for blue and black ballpoint pen inks [1, 4, 13]. However, there is little information regarding the calculation of the discriminating power of high performance thin layer chromatography (HPTLC) in the analysis of red ballpoint pen inks. Since red pen inks are most often used in threatening letters, the authors decided to investigate

the feasibility of HPTLC for analysing red ballpoint pen inks.

Despite the widespread use of instrumental techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometric techniques, HPTLC remains one of the most flexible, reliable and cost-efficient separation techniques, ideal for the analysis of pen inks. The advantages of HPTLC include short analysis time, relatively low running costs compared to instrumental techniques, a well-established protocol, and ready availability of the apparatus and chemicals. These make it one of the most frequently chosen ink analysis techniques. In addition, HPTLC has proven to be effective, not only for the comparison of inks but also for matching inks to a database of chromatograms. Recently, Neumann and Margot pre-

sented a statistical framework to manage a blue ballpoint pen ink database using data obtained solely from HPTLC [8, 9, 10, 11]. The authors decided to make an effort to fill in the gap in current analytical methodology of forensic questioned document examination, and, further, to lay the groundwork for a database of information on red ballpoint pen writing inks available in Malaysia. Therefore, the aim of this paper was to study the feasibility of using HPTLC to classify and discriminate red ballpoint pen inks.

2. Materials and methods

2.1. Samples

A total of 12 red ballpoint pen ink samples were collected for the study from various ballpoint pen models produced by different manufacturers. All pens were allocated a reference number during this study. The brand and model names of the investigated ink samples are listed in Table I. Four different individual pens were sampled for each pen model. Experimental work was carried out on inks extracted from ink deposited on white photocopier paper. All papers used for writing were from the same batch to avoid substrate variability.

TABLE I. ID NUMBER OF ALL STUDIED PEN MODELS

Manufacturer (brand)	Model	ID number
Bic	Round Stic Grip Fine	A
Carera	BOB	B
	88 F	C
FC	GRIP RT 0.7	D
g'soft	R100 Fine	E
	BP-GS-56 0.7	F
PM	KV2 F	G
	KM F PT	H
	KM 100 LV M	I
	KM M	J
Reynolds	240 M	K
	243 SOFT INK X-F	L

2.2. Chemicals

The chemicals used throughout the experiments were methanol (MeOH), ethanol and ethyl acetate produced by Fisher Scientific (UK). Rhodamine B and rhodamine 6G dyes were purchased from Acros

Organics, USA. Distilled water was used to prepare all solutions. An HPTLC silica gel plate 60 with layer thickness 0.2 mm, and 20 × 20 cm aluminium cards (Merck, Germany), and horizontal developing chambers were used for chromatographic separation of dyes in ink entries. The research was carried out at the forensic science laboratory (Faculty of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia).

2.3. Preparation of samples

Each of the pens was used to write the word "Forensic" with fixed dimensions (about 1 cm × 0.5 cm) on a piece of white paper. After the ink was deposited on the paper, the absorbed ink was extracted with 200 µl of methanol in a polypropylene micro vial. A blank sample was prepared by treating blank white paper (of similar dimensions to the ink entry) with methanol, rhodamine B and rhodamine 6G were prepared as standard reference dyes by dissolving the dye with methanol.

2.4. High performance thin layer chromatography analysis

The origins were 1.5 cm from the base of the plates. HPTLC analyses were performed using ethyl acetate, ethanol and distilled water (7:3:2) as an eluent mixture. Each extracted ink sample was spotted manually using a capillary tube. Rhodamine 6G and rhodamine B were used as standard dyes, and a paper and solvent blank were included in each run.

The mobile phase was prepared freshly every day. It was replaced after every two runs. Before daily operation, the tank was conditioned with the mobile phase for at least 20 min. A uniform origin position on the plates, proper loading at the origin, and solvent saturation in the developing tank were maintained during all the HPTLC analyses to ensure high reproducibility.

2.5. Discriminating power (DP) calculation

The discriminating powers (DP) of the different brands and models were calculated according to Smalldon and Moffat [12], where: $DP = (\text{number of discriminated pairs})/(\text{number of possible pairs})$.

3. Results and discussions

3.1. HPTLC analysis

HPTLC profiles of the 12 studied red pen inks are shown in Figure 1. In general, the HPTLC profiles of all 12 studied inks were very similar. All the inks and both reference dyes, i.e. Rhodamine B and Rhodamine 6G, were fluorescent under UV at 365 nm, except sample D. Under illumination of UV light at 365 nm, rhodamine B and rhodamine 6G emitted yellow and green lights, respectively (Figure 2).

Almost all red pen inks contained rhodamine 6G as their major colouring agent. Only a few pen samples also contained rhodamine B in addition to rhodamine 6G. The HPTLC results reflect the fact that rhodamine 6G is the main colouring agent present in the red pen inks. Previous literature reports also agreed with our observation that rhodamine 6G dye is one of the main colouring agents in red pen inks [2, 3].

On the other hand, the solvent blank and the paper blank did not give any observable band under normal white light and UV light. The R_f values recorded for each band of each pen model were the average values calculated for dye profiles obtained from four different individual pens of a particular pen model. By analyzing four different individual pens for each pen model, we aimed to average out and minimize any errors. It was observed that ink profiles as well as the associated R_f values of a single pen model ink extracted from four different individual pens were highly similar (for examples, see Figure 2). In other words, this means that the inks were fairly homogeneous across different individual pens that were produced within a single production batch for a selected pen model.

3.2. Classification and differentiation

As can be seen in Figure 1, HPTLC results enabled us to classify 12 red pen ink samples into three groups based upon the colouring agent present. Group 1 (G1) consisted only of sample D, which did not have rhodamine B or rhodamine 6G in its ink composition. Samples B, C, E, and F (i.e. both Carera models and both g'soft models), on the other hand, evidenced the presence of both rhodamine 6G and rhodamine B in their ink composition, and were placed into group 2 (G2). The third group (G3) consisted of the remaining samples: A, and G–L, i.e. Bic, PM and Reynolds, which contain only rhodamine 6G dye.

On first impression, it seemed as if sample D contained rhodamine B, but the absence of fluorescence confirmed that the band did not originate from rhodamine B. Under normal white light, sample D showed a pink-coloured band with an R_f value very close to that of rhodamine B (Figure 1). However, careful examination of the HPTLC plate under 365 nm UV light indicated that the band was not from rhodamine B. The band did not fluoresce under UV light, unlike rhodamine B, which glows fluorescent under UV light, as shown in Figure 2. In this way, sample D was discriminated from the other 11 ink samples.

Within G2, the Carera and g'soft pen models can be further differentiated from each other. First of all, HPTLC chromatograms of samples E and F showed an extra band for another dye, which was absent in samples B and C. As shown in Figure 1, both models of Carera, i.e. sample B and C, were different from both models of g'soft, i.e. sample E and F, due to the presence of the uppermost brown-coloured band. In addition, the colour intensity of the pink-coloured

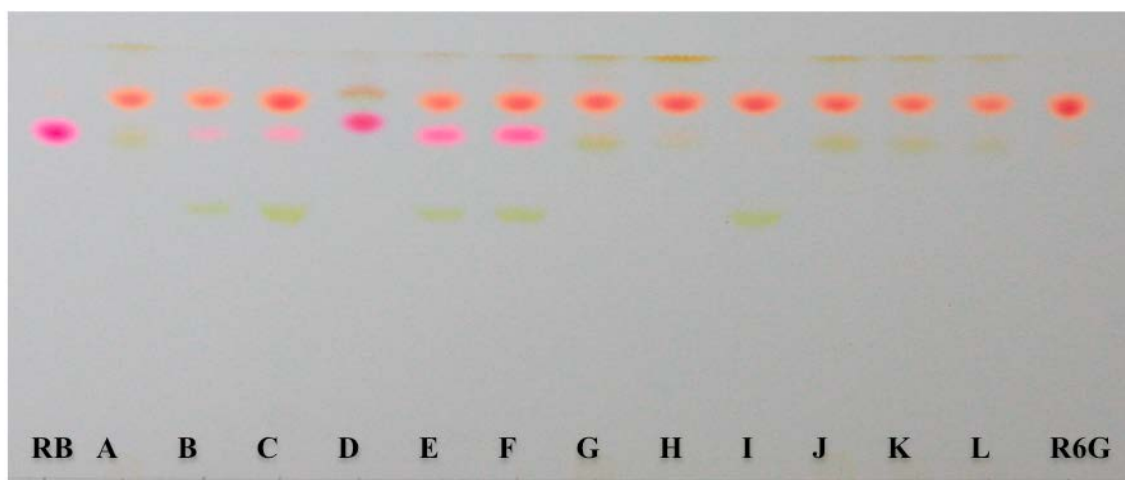


Fig. 1. HPTLC plate with chosen red ballpoint pen inks (A–L). First and last tracks are standard dye rhodamine B and rhodamine 6G, respectively.

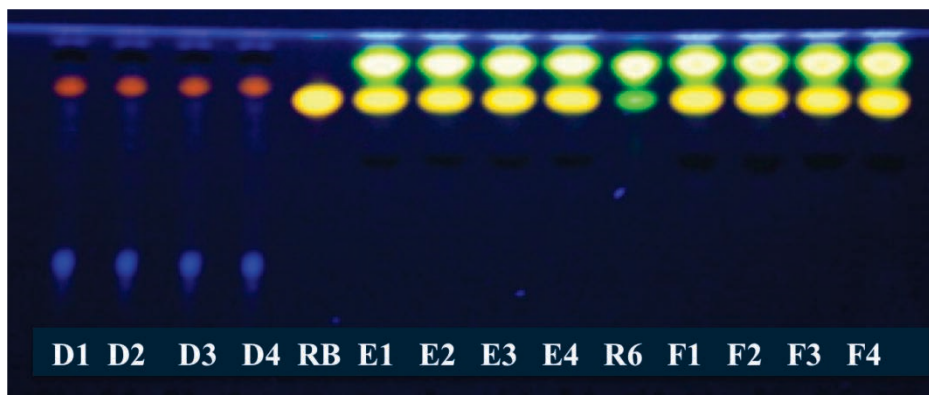


Fig. 2. HPTLC plate showing dye profiles of sample D (track 1–4), rhodamine b (track 5), sample E (track 6–9), rhodamine 6G (track 10) and sample F (track 11–14). Each pen model is represented by four different spots that were prepared from four different individual pens.

band exhibited by samples E and F was higher than the parallel band shown by samples B and C (Figure 1). However, models from the same brand (producer) could not be distinguished from each other. Perhaps colourless components, i.e. additives, could be used to discriminate models within a single manufacturer.

The third group (G3) included results obtained for inks of producers other than FC, Carera and g'soft – i.e. Bic, PM and Reynolds. Their chromatogram profiles were characterized predominantly by one single prominent band of Rhodamine 6G. As a consequence, they were less informative than those composed of more than one dye. However, Pen I and H could be further differentiated from the remaining pens within G3. On the one hand, among the seven pen models, Pen I was the only one that did not exhibit a brown-coloured band (uppermost position), while showing non-fluorescent and intense yellow-coloured bands (Figure 1). On the other hand, Pen H was the only one that did not give any yellow-coloured band. Nonetheless, there was some possibility of distinguishing between the ink extracts of the remaining pen models by calculating the relative colour intensity of bands. However, this study did not determine the relative colour intensity of bands due to the unavailability of a CAMAG TLC Scanner with WinCats software (CAMAG AG, Switzerland).

3.3. Discriminating power (*DP*)

Figure 3 shows the summary results of differentiation of inks from 12 red pen models. The discriminating power (*DP*) of the technique employed in this work was evaluated according to Smalldon and Mofat [12] as $DP = (\text{number of discriminated sample pairs})/(\text{number of possible sample pairs})$.

In the group of 12 red ballpoint pen inks, 66 possible pairs of samples were created for comparison. It was found that all except 15 pairs can be identified based on their HPTLC chromatogram (Figure 1 and 2). Thus the *DP* is equal to about 77%: $DP = (66 - 15)/66 = 51/66 = 77.27\%$.

A higher *DP* could be achieved by taking into account the relative intensity of colours of bands.

It should be noted here that certain pens were indistinguishable; a complete identification thus requires an additional analysis, such as quantitative HPLC. The occurrence of the same separation patterns is possibly attributable to the fact that different products from one manufacturer contain common dyestuff components, and that ink compositions are based on the limited raw dyestuffs provided by dyestuff makers, which are fewer in number compared to writing instrument makers [11].

4. Conclusions

A fast, simple and cheap methodology was developed for analysis of red ballpoint pen ink entries deposited on white paper. The HPTLC results suggested that Rhodamine 6G is the main colouring agent found in red pen ink. The results demonstrated the effectiveness of the method in classifying the investigated red pen inks based on their HPTLC chromatogram. The HPTLC technique proved to be suitable and fulfilled the basic criteria of questioned document examination: it enabled us to obtain analytical results with rather little document destruction and in a relatively short time. A searchable database of chromatograms of the numerous red inks available in Malaysia will enable us to evaluate the usefulness of this technique in routine forensic examinations.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
L		■	■	■	■	■		■	■		
K		■	■	■	■	■		■	■		
J		■	■	■	■	■		■	■		
I	■	■	■	■	■	■	■	■			
H	■	■	■	■	■	■	■				
G		■	■	■	■	■					
F	■			■							
E	■			■							
D	■	■	■								
C	■										
B	■										

	Pair that is distinguishable by HPTLC,
	pair that is indistinguishable by HPTLC.

Fig. 3. Differentiation of red ballpoint pen inks based on the HPTLC technique.

Acknowledgements

We would like to express our deep gratitude and appreciation to all the employees of the forensic science program from the Universiti Kebangsaan Malaysia. We highly appreciate the valuable comments from anonymous reviewers.

References

1. Causin V., Casamassima R., Marega C. [et al.], The discrimination potential of UV spectrophotometry, TLC, and FTIR for the forensic analysis of black and blue ballpoint inks, *Journal of Forensic Science* 2008, 53, 1468–1473.
2. Chen H. S., Analyses of four ballpoint pen inks and two dyes by TLC with fluorescence detection and matrix assisted laser desorption time-of-flight and electrospray ionization mass spectrometry, *Forensic Science Journal* 2005, 4, 15–27.
3. Chen H. S., Identification of rhodamine 6G and rhodamine B dyes present in ballpoint pen inks using HPLC and UV-Vis spectrometry, *Forensic Science Journal* 2007, 6, 21–37.
4. Djozan D., Baheri T., Karimian G., [et al.], Forensic discrimination of blue pen inks based on thin layer chromatography and image analysis, *Forensic Science International* 2008, 179, 199–205.
5. Jones R. W., McClelland J. F., Analysis of writing inks on paper using direct analysis in real time mass spectrometry, *Forensic Science International* 2013, 231, 73–81.
6. Kher A., Mulholland M., Green E. [et al.], Forensic classification of ballpoint pen inks using high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy with principal components analysis and linear discriminant analysis, *Vibrational Spectroscopy* 2006, 40, 270–277.
7. Lee L. C., Muhamad R. O., Pua H., Systematic assessment of attenuated total reflectance – Fourier transform infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis for forensic analysis of black ballpoint pen inks, *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 2012, 16, 262–272.
8. Neumann C., Margot P., New perspectives in the use of ink evidence in forensic science. Part I: Development of a quality assurance process for forensic ink analysis by HPTLC, *Forensic Science International* 2009, 185, 29–37.
9. Neumann C., Margot P., New perspectives in the use of ink evidence in forensic science. Part II: Development and testing of mathematical algorithms for the automatic comparison of ink samples analysed by HPTLC, *Forensic Science International* 2009, 185, 38–50.
10. Neumann C., Margot P., New perspectives in the use of ink evidence in forensic science. Part III: Operational applications and evaluation, *Forensic Science International* 2009, 192, 29–42.

11. Neumann C., Ramotowski R., Genessay T., Forensic examination of ink by high-performance thin layer chromatograph – The United States Secret Service Digital Ink Library, *Journal of Chromatography A* 2011, 1218, 2793–2811.
12. Smalldon K. W., Moffat A. C., The calculation of discrimination power for a series of correlated attributes, *Journal of Forensic Science Society* 1973, 13, 291–295.
13. Zięba-Palus J., Kunicki M., Application of the micro-FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks, *Forensic Science International* 2006, 158, 164–172.

Corresponding author

Loong Chuen Lee
Universiti Kebangsaan Malaysia
Forensic Science Program
Faculty of Health Science
50300 Kuala Lumpur, Malaysia
e-mail: dkcindy@gmail.com

BADANIA UŻYTECZNOŚCI WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ DO ANALIZY CZERWONYCH PAST DŁUGOPISOWYCH WYKONYWANEJ NA POTRZEBY WYMIARU SPRAWIEDLIWOŚCI I ORGANÓW ŚCIGANIA

1. Wstęp

Analiza past długopisowych jest ważną częścią procesu analitycznego w przypadku badania autentyczności dokumentów. Wśród technik analitycznych, których zastosowanie do analizy past długopisowych na potrzeby wymiaru sprawiedliwości badano do tej pory, wymienić należy metody spektroskopowe i chromatograficzne [5, 6, 7]. Dotychczas opublikowano wiele prac opisujących siłę dyskryminacyjną różnych technik analizy instrumentalnej, które stosowano do rozróżniania past długopisowych, zwłaszcza niebieskich i czarnych [1, 4, 13]. Natomiast opublikowano stosunkowo niewiele prac odnoszących się do obliczania siły dyskryminacyjnej wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), którą zastosowano do analizy czerwonych past długopisowych. Autorzy zdecydowali się więc podjąć takie badania ze względu na fakt, że długopisy z pastą tego koloru są często używane do pisania listów z pogróżkami.

Pomimo powszechnego stosowania różnych metod analizy instrumentalnej, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz techniki spektrometrii mas, HPTLC pozostaje dalej najbardziej elastyczną, niezawodną i opłacalną techniką rozdziału, co sprawia, że jest idealna do analizy past długopisowych. Wśród zalet HPTLC wymienić należy krótki czas analizy oraz w miarę niskie koszty eksploatacji w porównaniu z innymi technikami analizy instrumentalnej, a także istnienie dobrze opracowanych procedur analitycznych oraz dostępność aparatury i odczynników. Fakt ten sprawia, że technika ta znajduje się wśród najczęściej wybieranych technik analitycznych. Ponadto udowodniono, że HPTLC jest techniką efektywną nie tylko przy porównywaniu próbek dowodowych past długopisowych, ale również w przypadku porównywania chromatogramów uzyskanych dla analizowanej próbki z chromatogramami zebranymi w odpowiednich bazach danych. Neumann i Margot w swoich pracach zaprezentowali modele statystyczne służące interpretacji wyników analiz niebieskich past długopisowych wykonanych wyłącznie za pomocą techniki HPTLC [8, 9, 10, 11]. Dlatego też autorzy zdecydowali się podjąć badania mające na celu wypełnienie luki w istniejącej metodologii analizy dokumentów, jak również przygotowali podwaliny pod budowę bazy danych czerwonych past długopisowych używanych w Malezji. W artykule przedstawiono rezultaty badań nad użytecznością techniki HPTLC do rozwiązywania

problemów klasyfikacji i porównywania czerwonych past długopisowych.

2. Materiały i metody

2.1. Próbkki

Przeanalizowano 12 próbek czerwonych past długopisowych pochodzących od różnych producentów, a stosowanych w różnych modelach długopisów (tabela I). Wszystkim długopisom przypisano identyfikatory literowe (tabela I). Do badań wybierano po cztery różne długopisy z każdego analizowanego modelu długopisu. Eksperymenty wykonywano, dokonując ekstrakcji pasty długopisowej naniesionej na biały papier, który używany jest w drukarkach i kserokopiarkach. W celu wyeliminowania zmienności jego składu między poszczególnymi seriami produkcyjnymi wszystkie kartki papieru pochodziły z tej samej serii.

2.2. Odczynniki

Jako odczynniki wykorzystano w eksperymentach metanol (MeOH), etanol i octan etylowy, które wyprodukowała firma Fisher Scientific (Wielka Brytania). Barwniki: rodamina B i rodamina 6G zakupiono w firmie Acros Organics (Stany Zjednoczone). Do przygotowania roztworów stosowano wodę destylowaną. Na aluminiowe płytki HPTLC (Merck, Niemcy) o rozmiarach 20 × 20 cm naniesiono żel silikonowy 60; jego warstwa miała grubość 0,2 mm. W analizie chromatograficznej barwników obecnych w badanych próbkach stosowano horyzontalną komorę rozwijającą. Badania prowadzono w laboratorium pracującym na potrzeby wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania (Wydział Nauk o Zdrowiu na Narodowym Uniwersytecie Malezyjskim).

2.3. Przygotowanie próbek

Każdym z wytypowanych do badań długopisów napisano słowo „Forensic” na powierzchni około 1 cm × 0,5 cm na arkuszu białego papieru. Następnie zabsorbowaną na papierze próbkę pasty długopisowej ekstrahowano za pomocą 200 µl metanolu w mikrofiolkach polipropylenowych. Próbka ślepa przygotowana była poprzez ekstrakcję taką samą ilością metanolu białej, niezapisanej

nej części kartki. Barwniki rodamina B i rodamina 6G użyte zostały jako próbki odniesienia po rozpuszczeniu ich w metanolu.

2.4. Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej

Punkt startowy umieszczony był 1,5 cm od brzegu płytki. Analizy z wykorzystaniem metody HPTLC wykonywano, stosując mieszaninę rozwijającą – octan etylowy, etanol i wodę destylowaną w stosunku 7:3:2. Próbkę każdego ekstraktu nanoszono na płytkę za pomocą kapilary. Na płytkę nanoszono również roztwory rodamin 6G i rodamin B (standardy barwników) oraz roztwór ślepej próby.

Roztwór fazy rozwijającej przygotowano codziennie i wymieniano każdorazowo po wykonaniu dwóch analiz. Przed analizą komora z fazą rozwijającą była kondycjonowana przez minimum 20 min. W celu zapewnienia wysokiej odtwarzalności analiz HPTLC uważano, aby położenie płytek w komorze rozwijającej było identyczne oraz aby punkt startowy, w którym umieszczano ekstrakty próbek, znajdował się w tym samym miejscu.

2.5. Obliczanie siły dyskryminacyjnej (DP)

Siła dyskryminacyjna (DP) stosowanej metodyki analitycznej do rozróżniania czerwonych past długopisowych stosowanych w różnych modelach długopisów wyprodukowanych przez różnych producentów obliczana była według zależności podanej przez Smalldon i Moffat [12], tj. $DP = (\text{liczba par próbek rozróżnionych})/(\text{liczba wszystkich analizowanych par próbek})$.

3. Rezultaty i dyskusja

3.1. Analiza HPTLC

Chromatogramy HPTLC 12 analizowanych czerwonych past długopisowych pokazano na rycinie 1 i są one bardzo podobne do siebie. Chromatogramy wszystkich past długopisowych za wyjątkiem chromatogramu uzyskanego dla próbki D oraz uzyskane dla obu barwników, tj. rodamin B i rodamin 6G, wykazywały fluorescencję w zakresie długości fali 365 nm. Przy tej długości fali rodamina B i rodamina 6G emitowały odpowiednio żółte i zielone światło (rycina 2).

Chromatogramy HPTLC wykazały, że w prawie wszystkich czerwonych pastach długopisowych rodamina 6G stanowiła główny barwnik. Tylko kilka past zawierało również rodaminę B oprócz rodamin 6G. Obserwacje poczynione przez autorów są zgodne z danymi zawartymi w piśmiennictwie [2, 3], gdzie podano, że barwnik rodamina 6G jest głównym składnikiem czer-

wonych past długopisowych. Jednocześnie ślepa próba rozpuszczalnika oraz ślepa próba ekstraktu z papieru nie dały żadnego pasma zarówno w świetle widzialnym, jak i w świetle w zakresie UV. Wartości R_f każdego z pasm widocznych na chromatogramach wszystkich modeli długopisów zostały oszacowane jako średnia z pomiarów uzyskanych dla każdego z czterech długopisów reprezentujących dany model. Dokonując analizy czterech długopisów tego samego modelu, zminimalizowano wpływ przypadkowych błędów na interpretację uzyskanych wyników. Zaobserwowano, że wartości R_f obliczone dla danego modelu długopisu były bardzo podobne (przykłady na rycinie 2). Oznacza to, że skład past długopisowych używanych w danym modelu (produkowanych w ramach tej samej partii produkcyjnej) jest w miarę jednorodny.

3.2. Klasyfikacja i rozróżnianie

Opierając się na wynikach analiz HPTLC zaprezentowanych na rycinie 1, podzielono 12 czerwonych past długopisowych na trzy podgrupy, głównie na podstawie obecności na chromatogramie pasma od danego barwnika. Grupa pierwsza (nazwana G1) składa się tylko z próbki D, która w swoim składzie nie miała ani rodamin B, ani rodamin 6G. Próbki B, C, E, i F (modele Carera i g'soft) posiadały zarówno rodaminę 6G i rodaminę B (grupa G2). Trzecia grupa, G3, zawierała pozostałe próbki, tj. A, G–L (długopisy firm Bic, PM i Reynolds). Pasty użyte w tych długopisach zawierały wyłącznie rodaminę 6G.

W pierwszym momencie można by przypisać próbce D obecność rodamin B, ale brak fluorescencji potwierdził, że pasmo nie pochodzi od tego barwnika. W zakresie światła białego próbka D posiadała różowy kolor oraz wartość R_f bardzo bliską dla rodamin B (rycina 1). Niemniej jednak dokładna analiza płytek HPTLC w świetle UV przy długości fali 365 nm uwidoczniła, że pasmo to nie wykazywało fluorescencji w zakresie UV, zaś rodamina B ją wykazuje, jak pokazano na rycinie 2. W ten sposób odróżniono próbkę D od innych 11 próbek.

W grupie G2 pasty używane w długopisach modelu Carera i g'soft mogą być odróżnione od siebie. Po pierwsze, chromatogramy HPTLC dla próbek E i F wykazują dodatkowe pasma dla innych barwników, których brak w próbkach B i C. Jak pokazano na rycinie 1, oba modele Carera (próbki B i C) były różne od obu modeli g'soft, tj. próbek E i F ze względu na obecność brązowego pasma. Ponadto intensywność różowego pasma występującego w próbkach E i F była większa niż odpowiadającego mu pasma występującego na chromatogramach próbek B i C (rycina 1). Niemniej jednak długopisy tej samej marki nie mogą być rozróżnione od siebie. Najprawdopodobniej dopiero analiza bezbarwnych dodatków użytych do produkcji pasty powinna pozwolić na odróżnienie długopisów tego samego modelu (producenta).

Trzecia grupa (G3) zawiera pasty długopisowe producentów innych niż FC, Carera i g'soft, tj. PM i Reynolds. Ich chromatogramy charakteryzowały się głównie występowaniem pojedynczego pasma pochodzącego od rodaminu 6G. W konsekwencji były one mniej informatywne niż te, które zawierały więcej niż jeden barwnik. Niemniej jednak długopisy I oraz H mogą być nadal rozróżnione od pozostałych długopisów w grupie G3. Patrząc z jednej strony, wśród siedmiu różnych modeli długopisów oznaczony jako I był jedynym, na którego chromatogramie nie stwierdzono pasma barwy brązowej wykazującego fluorescencję. Na chromatogramie zaobserwowano tylko pasma barwy żółtej (rycina 1). Z drugiej strony długopis oznaczony jako H był jedynym, którego chromatogram nie posiadał plamki barwy żółtej. Niemniej jednak możliwe jest rozróżnienie ekstraktów past długopisowych dzięki obliczeniu względnej intensywności barwy poszczególnych pasm. Ta część badań nie została jednak wykonana z powodu braku odpowiedniego skanera umożliwiającego określenie względnej intensywności barwy pasm, tj. skanera CAMAG TLC Scanner z programem WinCats (CAMAG AG, Szwajcaria).

3.3. Siła dyskryminująca (*DP*)

Na rycinie 3 zilustrowano rezultaty analizy mającej na celu rozróżnienie 12 czerwonych past długopisowych. Siłę dyskryminacyjną (*DP*) metody analitycznej zastosowanej w prezentowanych badaniach oszacowano zgodnie z metodą zaproponowaną w pracy Smalllona i Moffata [12], tj. $DP = (\text{liczba rozróżnionych par próbek})/(\text{liczba wszystkich możliwych par do rozróżnienia})$.

W grupie 12 czerwonych past długopisowych można było utworzyć łącznie 66 par próbek. Stwierdzono, że tylko 15 par nie mogło być rozróżnionych na podstawie wyników analiz HPTLC, tj. chromatogramów (ryciny 1 i 2). Tym samym $DP = (66 - 15)/66 = 51/66 = 77.27\%$.

Wyższą wartość *DP* można będzie uzyskać, gdy weźmie się pod uwagę względną intensywność barw porównywanych pasm.

Należy dodać, że nierozróżnione w tych badaniach pasty długopisowe mogą być zapewne zidentyfikowane po wykonaniu dodatkowych analiz, np. z wykorzystaniem ilościowej analizy HPLC. Podobieństwo uzyskanych chromatogramów związane jest z tym, że wiele produktów wytwarzanych przez tego samego producenta zawiera ten sam barwnik oraz że skład past długopisowych opiera się na ograniczonej liczbie barwników, które dostarczane są przez ograniczoną liczbę producentów, a ich liczba jest mniejsza niż liczba producentów długopisów [11].

4. Wnioski

Zaproponowano szybką, prostą i tanią procedurę analizy czerwonych past długopisowych naniesionych na kartkę białego papieru. Rezultaty metody HPTLC sugerują, że rodamina 6G jest najczęściej występującym barwnikiem w czerwonych pastach długopisowych. Przedstawione rezultaty potwierdzają również efektywność zaproponowanej metody do klasyfikacji analizowanych modeli długopisów na podstawie chromatogramów HPTLC. Technika HPTLC okazała się użyteczna i spełnia podstawowe kryteria technik stosowanych w analizie dokumentów, tj. umożliwia ona uzyskanie wyników analitycznych w stosunkowo szybkim czasie przy jednocześnie niewielkim uszkodzeniu dokumentu. Utworzenie odpowiedniej bazy danych chromatogramów różnych czerwonych past długopisowych dostępnych w Malezji pozwoli w przyszłości na ocenę przydatności tej techniki do rutynowej analizy past długopisowych na potrzeby wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania.

Podziękowania

Autorzy bardzo dziękują wszystkim osobom z Narodowego Uniwersytetu Malezyjskiego uczestniczącym w prezentowanych badaniach, jak również za cenne uwagi anonimowych recenzentów.